



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato in Sistemi Agroambientali- indirizzo Agroecosistemi mediterranei

Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali

SSD AGR/19- Zootecnica speciale

Valutazione della shelf-life e dei parametri di qualità della Vastedda della valle del Bélice sottoposta a quattro differenti packaging

IL DOTTORE
Dott.ssa Marisa Palmeri

IL COORDINATORE
Prof. Giuseppe Giordano

IL TUTOR
Prof. Massimo Todaro

CICLO XXVI
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2016

Indice

Abstract	1
-----------------	---

Riassunto	3
------------------	---

Capitolo 1

Introduzione	5
1.1 Vastedda della valle del Bélice: tecnica di produzione e caratteristiche	5
1.2 Confezionamento e shelf-life	8
1.3 Sistemi di confezionamento dei formaggi	13
1.3.1 Confezionamento sottovuoto	14
1.3.2 Confezionamento in atmosfera modificata (MAP)	15
1.3.3 Film biodegradabili e sistemi di confezionamento attivo	16
1.3.4 Rivestimenti sintetici a base di cere	18

Capitolo 2

Parte sperimentale: materiali e metodi	19
2.1 Caseificazioni, confezionamento e stoccaggio	19
2.2 Analisi microbiologiche	20
2.3 Analisi chimico-fisiche	23
2.4 Analisi sensoriale	24
2.5 Analisi statistica	26

Capitolo 3

Risultati e discussione	27
3.1 Analisi microbiologiche	27

3.2 Analisi chimico-fisiche	31
3.3 Analisi sensoriale	34
Conclusioni	39
Bibliografia	40

Abstract

In the last years, there has been a growing attention towards food quality and food safety, as well as an increasing demand for “natural” products, especially those enjoying a ‘recognition of quality’ status [Protected Designation of Origin (PDO), Protected Geographical Indication (PGI), and Traditional Specialty Guaranteed (TSG)], and recognition of ‘geographical indications and traditional specialties’ conferred by the European Community to promote and protect the names of quality agricultural products and foodstuffs (European Community, 2012). The strong link of these productions with territory and the application of “traditional” techniques and tools used for transformation provides the final products with authenticity, typicality and added value.

The Vastedda della valle del Belice” (VdB) is a typical and traditional cheese of the homonymous valley of West-Sicily (Italy) that, recently, gained the PDO status (GUE no. C 42/16 19.2.2010). This cheese is a stretched (*pasta filata*) cheese made with raw milk of Valle del Belice breed ewes without the addition of starter cultures, sealed under vacuum, refrigerated and consumed within three months after production.

The shelf-life is closely linked to the characteristics of the product, which affect the proteolytic and lipolytic biochemical transformations that occurring under the action of microorganisms. Even packaging system can affect the shelf-life and the choice of the most appropriate and suitable packaging method is generally carried out after the assessment of its effects on the organoleptic, chemical-physical and microbiological properties.

In this study it was evaluated the effect of 4 packaging technologies (vacuum, 2 MAP with different percentages of CO₂ and N₂ and paraffin) on shelf life and on microbiological, chemical, physical and sensorial characteristics of PDO Vastedda della valle del Belice cheese.

To achieve these objectives were carried out four experimental cheese-making. Cheeses produced in each process were packed with four different packaging technologies and have been subjected to physical, chemical, microbiological and sensorial analysis before packaging and after 15, 30, 60, 90, 120 and 180 days of storage at 4°C.

From the results obtained it was found that the four types of packaging may be considered almost equivalent from all points of view considered. The vacuum packaging was also the most appreciated by the sensory point of view with the higher satisfaction index, which increases during the storage period even reaching maximum values at the end of the storage period.

Riassunto

Negli ultimi anni si è diffuso un interesse crescente verso la qualità e la sicurezza alimentare, così come è aumentata la richiesta di prodotti naturali, in particolare quelli certificati da un marchio di qualità [Denominazione di Origine Protetta (DOP), Indicazione Geografica Protetta (IGP), Specialità Tradizionale Garantita (STG)] e quelli insigniti del riconoscimento di indicazione geografica e specialità garantita conferiti dalla Comunità Europea per promuovere e proteggere la qualità delle produzioni agroalimentari. La stretta correlazione di questi prodotti con il territorio e l'utilizzo di strumenti e tecniche di produzione tradizionali conferiscono al prodotto finale caratteristiche di autenticità e tipicità che danno indubbiamente un valore aggiunto.

La Vastedda della Valle del Belice è un formaggio tipico prodotto nell'omonima regione della Sicilia Occidentale che ha recentemente ottenuto il marchio DOP (GUE no. C 42/16 19.2.2010). È un formaggio a pasta filata prodotto con latte crudo di pecore di razza Valle del Belice senza l'aggiunta di colture starter, confezionato sottovuoto, refrigerato e consumato fresco entro mesi dalla produzione.

Il periodo di conservabilità di un prodotto è strettamente correlato alle caratteristiche intrinseche del prodotto stesso da cui dipendono le trasformazioni biochimiche proteolitiche e lipolitiche che si verificano per azione dei microrganismi naturalmente presenti. Anche il sistema di confezionamento può influire sulla shelf-life e la scelta del più opportuno ed idoneo metodo di confezionamento viene generalmente effettuata in seguito alla valutazione degli effetti sulle proprietà organolettiche, chimico-fisiche e microbiologiche.

In questo studio è stato valutato l'effetto di 4 tecnologie di packaging (sottovuoto, 2 MAP con differenti percentuali di CO₂ e N₂ e paraffina) sulla shelf-life e sulle caratteristiche

microbiologiche, chimico-fisiche e sensoriali del formaggio Vastedda della valle del Belice DOP.

Per il raggiungimento di tali obiettivi sono state effettuate quattro caseificazioni sperimentali. Le vastedde prodotte in ciascuna lavorazione sono state confezionate con le quattro diverse tecnologie di packaging e sono state sottoposte ad analisi chimico-fisiche, microbiologiche e sensoriali prima del confezionamento e dopo 15, 30, 60, 90, 120 e 180 giorni di conservazione.

Dai risultati ottenuti è emerso che le quattro tipologie di confezionamento possono considerarsi pressoché equivalenti da tutti i punti di vista. Il sottovuoto è risultato anche il più apprezzato dal punto di vista sensoriale con il più alto indice di gradimento che ha mostrato un trend in incremento durante l'intero periodo di conservazione raggiungendo addirittura valori massimi alla fine di tale periodo.

1 Introduzione

1.1 Vastedda della valle del Bélice: tecnica di produzione e caratteristiche

La Vastedda della valle del Bélice è un formaggio fresco, a pasta filata, prodotto con latte intero crudo di sole pecore di razza valle del Bélice, che ha ottenuto il marchio di Denominazione Origine Protetta (D.O.P.) dalla Unione Europea nel 2010 (Reg. UE n. 971 del 28.10.10).

La sua origine si fa risalire a diversi anni fa, quando in un’afosa giornata estiva un abile casaro pensò di recuperare un formaggio pecorino andato a male a causa dell’elevata temperatura tagliandolo e immergendo le fette in acqua o scotta calda. La pasta iniziò così a filare e riposta poi in un piatto prese la sua tipica forma. In tal modo si ottenne un formaggio completamente diverso e molto gradevole. La parola “vastedda” potrebbe essere riconducibile al termine dialettale “vasta” ovvero “guasta”, riferito alla pasta andata a male.

Le caratteristiche peculiari della vastedda sono:

- Forma: tipica di una focaccia con facce lievemente convesse;
- Dimensione: il diametro del piatto deve essere compreso tra 15 e 17 cm e l’altezza dello scalzo tra 3 e 4 cm;
- Peso: compreso tra 500 e 700 g in relazione alle dimensioni della forma;
- Superficie: priva di crosta, di colore bianco avorio, liscia compatta senza vaiolature e piegature; è ammessa la presenza di una patina di colore paglierino chiaro;
- Pasta: di colore bianco omogeneo, liscia, non granulosa, con eventuali accenni di striature dovute alla filatura artigianale; l’occhiatura deve essere assente o molto scarsa, così come la trasudazione;
- Aroma: caratteristico del latte fresco di pecora;
- Sapore: dolce, fresco e gradevole, con venature lievemente acidule;

- Percentuale di grasso: non inferiore al 35% sulla sostanza secca;
- Percentuale di cloruro di sodio (sale): non superiore al 5 % sulla sostanza secca.

La sua produzione avviene secondo quanto indicato nel disciplinare di produzione, sia per quanto attiene alla zona di produzione, che per la tecnica di trasformazione.

L'allevamento degli ovini di razza valle del Belice, la produzione del latte, la trasformazione ed il confezionamento devono avvenire all'interno dell'areale della valle del Belice, in particolare nei territori amministrativi dei seguenti comuni:

- a) in provincia di Agrigento: Caltabellotta, Menfi, Montevago, Sambuca di Sicilia, Santa Margherita di Belice e Sciacca;
- b) in provincia di Trapani: Calatafimi, Campobello di Mazara, Castelvetro, Gibellina, Partanna, Poggioreale, Salaparuta, Salemi, Santa Ninfa e Vita;
- c) in provincia di Palermo: Contessa Entellina e Bisacchino limitatamente alla frazione denominata "San Biagio".

Per la produzione della vastedda deve essere utilizzato latte crudo di sole pecore di razza valle del Belice, il cui sistema di alimentazione è costituito dal pascolo naturale e/o coltivato, da foraggi freschi, da fieni e paglia ottenuti nella zona di produzione, dalle ristoppie di grano e dai sottoprodotti vegetativi (l'erba cresciuta lungo i filari dei vigneti, frasche di ulivo della potatura invernale, cladodi di ficodindia, foglie di vite dopo la vendemmia). E' consentita l'integrazione con granella di cereali, con leguminose e concentrati semplici o complessi NO OGM. Nell'alimentazione è vietato l'utilizzo di prodotti derivati di origine animale e di piante o parti di piante (semi) di trigonella, tapioca e manioca.

Il latte deve provenire da una o due mungiture, quella serale e quella del mattino successivo; la lavorazione deve essere eseguita entro 48 ore dall'effettuazione della prima mungitura. E' consentita pertanto la refrigerazione del latte nel pieno rispetto dei valori minimi previsti dalle vigenti disposizioni legislative in materia. Il latte opportunamente filtrato con appositi setacci

e/o filtri in tela, è riscaldato tradizionalmente in caldaie di rame stagnato, fino alla temperatura massima di 40° C con fuoco diretto di legna o gas; quindi alla temperatura di 36-40° C viene aggiunto caglio in pasta di agnello.

Il caglio utilizzato per la coagulazione essenzialmente presamica del latte si ricava dall'abomaso di agnelli lattanti di razza valle del Belice, allevati esclusivamente con latte materno. Il caglio in pasta, prima dell'uso, viene sciolto in acqua tiepida e quindi filtrato. La quantità impiegata, si aggira fra i 60-100 grammi per 100 litri di latte, con un tempo di coagulazione che varia da 40 a 50 minuti e comunque fin tanto che la rotula immersa nella tina in legno rimane in posizione verticale.

Formata la cagliata, questa deve essere rotta in granuli molto piccoli, con l'ausilio di un mestolo, detto rotula, recante una protuberanza all'apice, necessaria per una rottura omogenea della cagliata, fino ad ottenere grumi delle dimensioni di un chicco di riso; la sineresi spontanea è favorita dall'acqua calda aggiunta durante la rottura della cagliata. I granuli di cagliata depositati sul fondo del recipiente, vengono lasciati riposare per cinque minuti, affinché avvenga la coesione fra essi, quindi la massa caseosa viene prelevata dalla tina e depositata in fuscelle di giunco senza operare nessuna pressatura della pasta. La cagliata viene quindi lasciata all'interno delle fuscelle in giunco a temperatura ambiente per la maturazione (fermentazione naturale della pasta). Il tempo necessario per la maturazione cambia con il variare della temperatura dell'ambiente (più fresco è il locale maggior tempo è richiesto).

Dopo 24 ore, ma nella stagione fredda anche dopo 48 ore, valutato il grado di acidificazione della pasta con pH-metro portatile (pH compreso fra 4,8 e 5,2) e/o mediante prove di filatura della pasta, la cagliata è tagliata a fette, posta in un recipiente in legno, detto "piddiaturi" e ricoperta di scotta o acqua calda alla temperatura di 80-90° C. Il tutto si rimuove blandamente con la paletta in legno, onde favorire la fusione in un unico blocco. Si procede quindi alla filatura della cagliata dopo un tempo di immersione della pasta di 3-7 minuti.

Il processo di filatura indubbiamente rappresenta un CCP (*critical control point*) in grado di ridurre la contaminazione microbica soprattutto da parte di microrganismi patogeni (Mucchetti et al., 1997).

Successivamente si inizia la fase di lavorazione della pasta fuori dalla scotta o dall'acqua calda, formando dei cordoni che vengono ripiegati in due ed amalgamati a modo di trecce. Quando la pasta avrà assunto una superficie bianco-lucida si distaccano dalla massa delle porzioni a forma di sfera che vengono lavorate manualmente e richiuse nel punto di distacco. La saldatura avviene stringendo speditamente tra il pollice e l'indice le labbra della sfera, che inizialmente si presentavano sfaldate. Si pongono poi con la chiusura in basso in piatti fondi in ceramica, ove, dopo essere stati rivoltati, assumeranno la forma caratteristica della Vastedda.

La pasta, molto spurgata, rassoda rapidamente. Successivamente, quando le forme raffreddano e prendono consistenza (dopo 6-12 ore dalla filatura) si procede alla salatura; questa viene condotta ponendo le forme di formaggio in salamoia satura di sale da cucina a temperatura ambiente, per un tempo compreso tra 30 minuti e 2 ore. Segue poi l'asciugatura in locali freschi e moderatamente ventilati e dopo 12-48 ore ed il confezionamento in buste di polietilene sigillate sottovuoto. Il prodotto finito, confezionato ed etichettato, viene pertanto immesso in commercio riportando una data di scadenza che dipende dalla scelta dell'OSA (operatore dei servizi alimentari) ma che, attualmente, è stata fissata dal Consorzio di Tutela a tre mesi dalla produzione.

1.2 Confezionamento e shelf-life

Il confezionamento ed il periodo di conservazione degli alimenti sono due aspetti molto importanti inerenti i temi di sicurezza, tracciabilità, rintracciabilità e commercializzazione. Vista la loro rilevanza e l'impatto che una gestione non corretta di tali processi potrebbe avere sui

consumatori, nel corso degli anni si è reso necessario un continuo adeguamento ed aggiornamento normativo.

L'articolo 1 del regolamento UE 1669/2011 al punto *e* definisce *alimento preimballato* “l'unità di vendita destinata a essere presentata come tale al consumatore finale e alle collettività, costituita da un alimento e dall'imballaggio in cui è stato confezionato prima di essere messo in vendita, avvolta interamente o in parte da tale imballaggio, ma comunque in modo tale che il contenuto non possa essere alterato senza aprire o cambiare l'imballaggio”.

Il confezionamento è una fase molto importante della filiera alimentare, in quanto protegge l'alimento dalle contaminazioni (funzione di difesa) e sollecitazioni esterne (funzione meccanica), ha funzione di contenimento (essenziale per gli alimenti liquidi) e permette il trasporto, lo stoccaggio e la distribuzione del prodotto fino al raggiungimento del consumatore finale. Oltre alla funzione tecnica, il sistema di confezionamento ha anche una funzione commerciale, in quanto può condizionare la scelta del consumatore.

Il sistema di confezionamento viene scelto in base alla natura ed alle proprietà intrinseche del prodotto, preferendo quello che meglio riesce a preservare le caratteristiche organolettiche, chimico-fisiche ed a mantenere entro i limiti di legge i parametri microbiologici indicatori delle condizioni igienico-sanitarie, tutti elementi che concorrono a definire e mantenere la qualità del prodotto stesso.

Di particolare importanza è anche la valutazione della shelf-life e generalmente la scelta del packaging viene effettuata anche alla luce di un possibile allungamento di tale periodo.

Con il termine “shelf-life” si intende il periodo di tempo successivo al confezionamento durante il quale le degradazioni chimiche, chimico-fisiche e biochimiche dei vari componenti provocano, in un qualunque prodotto alimentare, piccole modificazioni delle caratteristiche sensoriali e comunque ancora accettabili dal punto di vista della sicurezza d'uso (Riva, 2001).

Tali parametri possono essere influenzati da diversi fattori, quali l'esposizione alla luce, la

temperatura, le sollecitazioni meccaniche, la contaminazione microbica, i gas, l'umidità e l'imballaggio.

Possiamo distinguere:

- Shelf-life primaria: periodo di tempo nel quale un prodotto alimentare, in specifiche condizioni di confezionamento, stoccaggio e distribuzione, mantiene caratteristiche igienico-sanitarie, nutrizionali e/o sensoriali accettabili;
- Shelf-life secondaria: periodo di tempo nel quale un prodotto alimentare, in specifiche condizioni di conservazione, mantiene caratteristiche igienico-sanitarie, nutrizionali e/o sensoriali accettabili dopo l'apertura della confezione.

Il rapporto tra shelf-life primaria e shelf-life secondaria rappresenta l'estensione di vita dovuta al packaging e quindi la minima vita di scaffale che un prodotto deve avere per restare competitivo sul mercato.

Per *termine minimo di conservazione* (Reg. UE 1169/2011) si intende la data fino alla quale un prodotto conserva le sue proprietà specifiche in adeguate condizioni di conservazione. Il produttore è tenuto ad indicare sull'etichetta del prodotto il termine minimo di conservazione o la data di scadenza, nel caso di prodotti altamente deperibili.

Come stabilito dall'articolo 3 del regolamento CE 2073/2005 è compito del produttore (OSA) garantire che i criteri di sicurezza microbiologici fissati dal regolamento stesso siano mantenuti e rispettati durante l'intero periodo di conservazione. Se necessario, il produttore ha il compito di condurre degli studi che verifichino il mantenimento di tali requisiti. Ciò può essere effettuato mediante modelli matematici predittivi stabiliti per il prodotto in esame, prove di inoculazione e sviluppo dei patogeni durante il periodo di conservabilità e studi per la valutazione della sopravvivenza e dello sviluppo dei microrganismi presenti nel prodotto durante tale periodo, in funzione delle condizioni di distribuzione, conservazione ed uso.

La durata di tale periodo di tempo è indubbiamente correlata alle caratteristiche intrinseche del prodotto ed alle modalità di trasformazione, conservazione e consumo.

La shelf-life degli alimenti è condizionata da un insieme di reazioni biochimiche degradative a carico dei costituenti principali e di natura microbiologica, legate all'azione dei microrganismi alterativi e/o patogeni che possono svilupparsi durante il periodo di conservazione. Gli alimenti in generale sono molto suscettibili all'attacco di batteri degradanti (Smith et al., 2004; Haouet et al., 2006; Galic' et al., 2009). E' stato dimostrato, in particolare, che alcuni prodotti alimentari, quali i lattiero-caseari a pasta fresca, sono molto suscettibili a processi degradativi provocati da muffe, *Pseudomonas* spp. ed enterobatteri (Cantoni et al., 2003; Parisi 2003a-b; Papaioannou et al., 2005; Haouet et al., 2008).

Le alterazioni microbiologiche oltre a provocare una riduzione della shelf-life, possono anche essere la causa di malattie a trasmissione alimentare (Quintavalla e Vicini, 2002).

Le produzioni lattiero-casearie, in particolare i formaggi freschi sono caratterizzati da una shelf-life molto breve, dovuta a diversi fattori chimico-fisici quali il pH, l'elevata attività dell'acqua (a_w) ed il basso contenuto di sali. In presenza di ossigeno tutti questi fattori favoriscono la crescita di microrganismi indesiderati, quali batteri psicrotrofi, alterativi, funghi e lieviti che riducono la shelf-life dell'alimento (Di Marzo et al., 2006; Verdini e Rubiolo, 2002). A causa della grande disponibilità di nutrienti presenti nel latte, i formaggi a latte crudo possono ospitare una notevole quantità di batteri patogeni (Donnelly, 2004).

Il pH e l'attività dell'acqua (a_w) sono due parametri che condizionano fortemente la stabilità dei formaggi durante la stagionatura e la conservazione.

L'attività dell'acqua, definita termodinamicamente come il rapporto tra la pressione del vapore acqueo presente nel sistema e la pressione dell'acqua pura alla stessa temperatura, è direttamente proporzionale all'umidità ed inversamente proporzionale alla concentrazione di NaCl e di altri composti a basso peso molecolare. Nella fase immediatamente successiva alla

produzione, i formaggi hanno valori di a_w pressoché vicini all'unità ($a_w \sim 0.99$) che permettono la crescita dei batteri lattici con funzione di starter, i cui prodotti del metabolismo sono essenziali per l'acidificazione; infatti l'acido lattico prodotto determina un abbassamento di pH che, in combinazione con la cottura ed il mescolamento, promuove la sineresi della cagliata e l'espulsione del siero (Walstra, 1993).

La riduzione dei valori di pH per effetto della fermentazione del lattosio ad acido lattico favorisce, almeno inizialmente, l'inibizione della crescita di molti batteri patogeni. Dopo la sineresi della cagliata e la successiva aggiunta di sale si assiste ad un abbassamento dei valori di a_w , che favorisce un controllo dell'attività e della moltiplicazione dei microrganismi. Tale decremento prosegue durante il periodo di conservazione dei formaggi, fino a che la superficie del formaggio non è in equilibrio con l'atmosfera circostante. Parallelamente si assiste ad una variazione dei valori di pH che vanno incontro ad un incremento, in conseguenza della formazione di composti alcalini provenienti dal catabolismo dell'acido lattico (Robertson, 1993).

Il valore ottimale per la crescita dei batteri, generalmente è intorno alla neutralità, per cui le specie batteriche non acido tolleranti, vengono inibite dai valori tra 4,5 e 5,3 che il pH raggiunge dopo la caseificazione, ma possono ritrovare l'ambiente favorevole alla loro crescita durante il periodo di stagionatura e/o conservazione.

Il sale contribuisce al *flavour*, alla struttura, all'attività enzimatica e alla stabilità microbiologica dei prodotti (Guinee et al., 2004).

Anche la presenza di luce e di ossigeno possono influenzare la stabilità delle produzioni lattiero-casearie durante la conservazione, provocando l'ossidazione dei grassi, causa principale dello sviluppo di odori sgradevoli. La presenza di ossigeno può inoltre favorire lo sviluppo di popolazioni microbiche indesiderate.

1.3 Sistemi di confezionamento dei formaggi

Negli ultimi anni è sempre maggiore l'attenzione dei consumatori verso la qualità dei prodotti presenti sulla propria tavola, sia in relazione alla provenienza ed ai sistemi di produzione utilizzati, che ai requisiti di salubrità e sicurezza che insieme concorrono a definire la qualità del prodotto. La riscoperta di cibi naturali e tradizionali prodotti senza l'aggiunta di sostanze chimiche è sempre più attuale, così come il consumo di prodotti ottenuti con tecnologie che utilizzano strategie di bioconservazione (Settanni et al., 2008), ovvero di sistemi che permettono l'estensione della shelf-life ed il miglioramento della sicurezza alimentare attraverso microrganismi e/o prodotti del loro metabolismo (Ross et al., 2002).

Il packaging rappresenta senz'altro uno degli aspetti più rilevanti, dal punto di vista del marketing, in quanto è noto a molti come il sistema di confezionamento possa influire sul mantenimento delle proprietà degli alimenti, garantendo standard qualitativi elevati anche a distanza dal momento e dal sito di produzione.

Nel confezionamento degli alimenti un elemento chiave è sicuramente rappresentato dagli imballaggi che possono essere distinti in tre categorie funzionali:

1. Imballaggio primario (confezionamento): è il primo involucro o contenitore che riveste il prodotto per la vendita (ad esempio scatole, blister, barattoli, bottiglie, etc.) posto a diretto contatto con il prodotto e avente funzione di protezione chimico-fisica nei riguardi dei fattori ambientali che possono causare la degradazione del prodotto, e funzione conservativa nei riguardi delle caratteristiche stesse del prodotto (es. umidità, aromi). E' concepito in modo da costituire nel punto vendita, un'unità di vendita per l'utente finale o per il consumatore (art. 35 lett. b D.lgs. 22/1997);
2. Imballaggio secondario: è l'involucro esterno che consente il raggruppamento di un certo numero di unità di vendita, indipendentemente dal fatto che sia venduto come tale

all'utente finale, o che serva a facilitare il rifornimento degli scaffali e la protezione meccanica del prodotto durante le operazioni di immagazzinamento e trasporto (art. 35 lett. c D.lgs. 22/1997);

3. Imballaggio terziario: è l'involucro esterno che ha il compito di facilitare la manipolazione ed il trasporto di un certo numero di unità di vendita.

Imballaggio secondario e terziario servono solo alla movimentazione ed al trasporto dell'alimento, mentre l'imballaggio primario è quello che ha effetto sulla conservazione dell'alimento.

1.3.1 Confezionamento sottovuoto

Il confezionamento sottovuoto è uno dei sistemi di packaging maggiormente diffusi per la conservazione dei formaggi e degli alimenti in generale per la facilità d'uso, perché è in grado di mantenere elevate per lungo tempo le caratteristiche del prodotto e per un basso impatto in termini di costi.

Il confezionamento sottovuoto, che può essere fatto con macchine a campana, ad estrazione esterna o con macchine per processi industriali, ha la funzione principale di sottrarre aria all'interno delle buste in materiale plastico in cui si pone l'alimento e di creare un ambiente ostile allo sviluppo dei microrganismi aerobi, che pertanto non si sviluppano o si sviluppano più lentamente non provocando in tal modo alterazioni del prodotto.

Diversi studi hanno dimostrato da tempo come il confezionamento mediante dei sistemi chiusi ermeticamente (come sottovuoto, atmosfera modificata) sono in grado di ritardare e rallentare la crescita di microrganismi alterativi, che altrimenti si svilupperebbero facilmente sulla superficie dei formaggi (Pluta et al., 2003; Pikul et al., 2006).

1.3.2 Confezionamento in atmosfera modificata (ATM o MAP)

Il confezionamento in atmosfera modificata viene effettuato ponendo gli alimenti in buste di materiale plastico (generalmente polietilene) all'interno delle quali viene iniettata una miscela di gas inerti con composizione variabile.

Nel corso degli anni tale tipologia di confezionamento degli alimenti freschi si è affermata notevolmente grazie alla sua capacità di mantenere le proprietà dei prodotti freschi, di migliorare l'immagine dei prodotti, di allungare la shelf-life e di ridurre o eliminare l'utilizzo di additivi chimici e conservanti (Garabal et al., 2010).

I gas utilizzati per tale scopo sono principalmente l'anidride carbonica (CO₂), l'azoto (N₂) e l'ossigeno (O₂) (Esmer et al., 2009; Gammariello et al., 2009).

Molti autori hanno dimostrato l'efficacia della MAP nell'estendere la shelf-life dei prodotti lattiero-caseari (Floros et al., 2000; Papaioannou et al., 2007). Tale azione è tuttavia correlata ad alcuni fattori quali il tipo di formaggio, l'utilizzo di starter, la contaminazione iniziale e le condizioni di conservazione (Floros e Nielsen, 2000).

Dal punto di vista microbiologico la CO₂ è senza dubbio il gas più efficace nell'inibire la crescita di diversi microrganismi (Daniels et al., 1985), mentre l'azoto sostituisce l'aria nella confezione, impedisce lo schiacciamento e la deformazione dei prodotti e l'aderenza tra loro all'interno della confezione (affettati) ed ostacola la decolorazione del prodotto. L'azoto non svolge azione antibatterica o antimicotica diretta, ma non favorisce lo sviluppo dei microrganismi e non ha alcun effetto sull'aroma (Colchin et al., 2001). L'ossigeno sostituisce l'aria nella confezione e nel prodotto e, in base alle concentrazioni, è l'elemento che consente la vita ai microrganismi aerobici, quindi è un elemento indesiderato nella confezione, anche se bisogna considerare che i gas tecnici sono completamente sterili e sostituiscono l'aria che può essere inquinata.

Diversi studi hanno messo in evidenza l'effetto inibitorio della CO₂ sulla crescita dei microrganismi patogeni ed alterativi che si esplica mediante malfunzionamento delle membrane cellulari, alterazioni fisico-chimiche dirette a carico di proteine e lipidi di membrana, inibizione dei principali sistemi enzimatici, variazioni del pH intracellulare ed inibizione della divisione cellulare con alterazioni della morfologia (Farber et al., 1991; Pintado e Malcada, 2000).

Moir et al. (1993) hanno dimostrato che una MAP con il 40% di CO₂ è in grado di inibire la crescita di *Pseudomonas spp.* inoculato in una prova sperimentale su formaggio Cottage.

Eliot et al. (1998) hanno altresì dimostrato che la mozzarella confezionata in MAP con il 75% di CO₂ è protetta meglio dalla crescita di microrganismi indesiderati e dalla formazione di gas.

Tuttavia la CO₂ degrada molte componenti aromatiche importanti per lo sviluppo dei *flavour* del formaggio ed inibisce lo sviluppo di microrganismi essenziali per lo sviluppo dell'aromaticità del prodotto.

Alcuni studi hanno inoltre evidenziato lo sviluppo di un aroma "frizzante" in formaggi conservati in MAP costituite da CO₂/N₂, e tale effetto veniva notevolmente ridotto quando tale rapporto si invertiva a favore dell'azoto, eliminando gli aromi pungenti ed indesiderati e mantenendo la freschezza, le caratteristiche aromatiche tipiche del prodotto, nonché controllando positivamente la crescita microbica (Esmer et al., 2009; Kosikowski e Brown, 1973).

1.3.3 Film biodegradabili e sistemi di confezionamento attivo

Negli ultimi anni l'uso massivo di sistemi di confezionamento che utilizzano film sintetici ha richiamato l'attenzione verso i problemi di inquinamento che ne potrebbero derivare.

I polimeri sintetici sono ampiamente utilizzati nei sistemi di confezionamento per le loro ottime proprietà barriera e per la il basso costo. Tuttavia essi sono quasi completamente non

biodegradabili e contribuiscono all'inquinamento ambientale (Durango et al., 2006; Tharanathan, 2003; Arvanitoyannis e Gorris, 1999).

Una potenziale alternativa a tali sistemi può essere rappresentata da materiali biodegradabili, ovvero quei materiali che vanno incontro a degradazione fisica, chimica, termica e biologica da cui si ricavano anidride carbonica ed acqua che possono essere usati come fertilizzanti in agricoltura (Direttiva 94/62/CE del Parlamento Europeo).

Questi sistemi per quanto innovativi ed altamente ecosostenibili, sono per la maggior parte poco vantaggiosi nella conservazione degli alimenti. Essi generalmente sono fatti di materiali biologici quali polisaccaridi, poliestere, proteine, lipidi e loro derivati, alcuni dei quali (polisaccaridi e proteine) non hanno buone proprietà barriera nei confronti di ossigeno ed acqua ed hanno una scarsa stabilità delle condizioni di umidità, mentre di contro altri (lipidi e poliestere) hanno buone proprietà barriera verso il vapore acqueo, ma sono di solito opachi e poco flessibili (Guilbert et al., 1996).

I film edibili di proteine e polisaccaridi hanno proprietà antimicrobiche e sono una promettente forma di sistema di packaging attivo in grado di migliorare la sicurezza alimentare e di aumentare la shelf-life attraverso il controllo microbiologico, in quanto possono ridurre il tasso di crescita dei microrganismi ed allungare la fase di crescita esponenziale o addirittura inattivare i microrganismi per contatto.

I sistemi di confezionamento attivo si sono dimostrati molto efficaci nel controllo della crescita dei microrganismi patogeni ed alterativi (Dutta et al., 2009).

I risultati di diversi studi (Moreira et al., 2011; Pereda et al., 2008) hanno evidenziato risultati molto promettenti che se accompagnati da una riduzione dei costi fanno pensare ad una sempre maggiore diffusione di tali sistemi di packaging negli anni futuri.

1.3.4 Rivestimenti sintetici a base di cere

Il rivestimento sintetico a base di cere e paraffina è uno dei sistemi di confezionamento utilizzati per regolare i processi di traspirazione dei formaggi, in quanto tali materiali alterano la cinetica di evaporazione dell'umidità del formaggio fino ad impedirla, influenzando il processo di maturazione.

L'utilizzo di tale sistema di confezionamento su formaggi freschi nella fase immediatamente successiva alla produzione rappresenta un valido strumento per mantenere l'umidità presente al momento del confezionamento e per consentire un'omogenea distribuzione dell'umidità all'interno dell'intera forma (Mucchetti e Neviani, 2006). Inoltre in base al momento in cui viene effettuato il rivestimento si può influenzare lo spessore della crosta fino addirittura ad impedirne la formazione, che in questo caso è rappresentata dalle stesse cere.

2 Parte sperimentale: materiali e metodi

Alla luce di quanto detto si è voluto mettere a punto uno studio in cui è stato valutato l'effetto di 4 tecnologie di packaging (sottovuoto, 2 MAP con differenti percentuali di CO₂ e N₂ e paraffina) sulla shelf-life e sulle caratteristiche microbiologiche, chimico-fisiche e sensoriali del formaggio Vastedda della valle del Belice DOP.

2.1 Caseificazioni, confezionamento e stoccaggio

Per il raggiungimento degli obiettivi del presente lavoro sono state effettuate quattro caseificazioni sperimentali nel mese di giugno 2014 a distanza di tre/quattro giorni l'una dall'altra, presso il caseificio della società agricola "Ovini e natura" sito in S. Margherita Belice. Durante ciascuna caseificazione sono stati utilizzati circa 200 litri di latte raccolti la mattina e la sera precedente e si è proceduto alla lavorazione secondo il disciplinare di produzione della DOP.

Al termine del processo produttivo le vastedde prodotte (circa 60 per lavorazione) sono state poste ad asciugare per circa 8 ore e successivamente messe in salamoia per 1 ora. Al termine di ciò si è proceduto al trasferimento in condizioni refrigerate presso i locali del Consorzio di Tutela della Vastedda della valle del Belice DOP sito in Poggioreale (TP), dove sono state confezionate e conservate fino alle scadenze prestabilite.

Le vastedde appartenenti a ciascun gruppo di lavorazione sono state suddivise in quattro gruppi corrispondenti alle quattro tipologie di confezionamento, ovvero:

1. Sottovuoto
2. MAP₁ (30% CO₂/ 70% N₂);
3. MAP₂ (100% N₂);

4. Paraffina

ed analizzate a 15, 30, 60, 90, 120 e 180 giorni di confezionamento.

Una forma di Vastedda proveniente da ciascuna lavorazione è stata analizzata al tempo zero senza essere confezionata, al fine di poter effettuare a posteriori una valutazione degli effetti della tecnologia di packaging e del tempo di conservazione.

Le vastedde confezionate sottovuoto ed in atmosfera modificata sono state poste in delle buste di poliammide biorientato (OPA) e polipropilene (PE) (15 µm OPA/75 µm PP) caratterizzati da un tasso di permeabilità dell'ossigeno di $30 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2} 24\text{h}^{-1}$ a 25°C (Alpak srl, Taurisano, Italy) e confezionate mediante un'apparecchiatura Lavezzini.

Il confezionamento in paraffina è stato effettuato immergendo le vastedde in paraffina liquida a 60°C per alcuni secondi e facendo successivamente solidificare il rivestimento per raffreddamento a temperatura ambiente.

Tutti i formaggi confezionati sono stati conservati e mantenuti alla temperatura di 4°C fino alle scadenze temporali prestabilite per le analisi.

2.2 Analisi microbiologiche

Al raggiungimento delle scadenze temporali prefissate si è proceduto all'apertura delle confezioni e le vastedde sono state aliquotate per essere sottoposte ad analisi.

30 gr di ciascuno dei campioni di vastedda sono stati pesati in un sacchetto tipo stomacher sterile ed omogenizzato in 270 ml di sodio citrato (soluzione 2%) in un omogenizzatore (Type 400; Seward London, UK) per 2 minuti alla velocità massima.

Da tale soluzione madre sono state preparate le diluizioni decimali utilizzando lo stesso diluente e si è proceduto a dispensare 1 ml di ciascuna diluizione in piastra Petri.

In particolare sono state effettuate le conte dei seguenti gruppi microbici:

1. **Carica Mesofila Totale (CMT):** semina per inclusione a doppio strato in Plate Count Agar (PCA). Dopo la solidificazione del terreno le piastre sono poste ad incubare a 30°C per 72 ± 3 h (ISO 4833:2013);
2. **Coliformi totali (CT):** semina per inclusione a doppio strato in Violet Red Bile Agar (VRBA). Dopo la solidificazione le piastre vengono incubate a 37°C per 24 ± 2 h (ISO 4832:2006); le colonie rosso porpora con diametro di almeno 0,5 mm sono considerate colonie tipiche e non necessitano conferma. Per le colonie atipiche viene fatto un test di conferma che consiste nell'inoculare almeno 5 colonie in tubi di brodo lattosio bile verde brillante ed incubando a 37°C per 24 ± 2 h. I coliformi producono gas nei tubi all'interno della campana di Durham.
3. ***Enterobacteriaceae*:** semina per inclusione a doppio strato in Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA). Dopo la solidificazione le piastre vengono incubate a 37°C per 24 ± 2 h (ISO 21528-2:2004); sono considerate caratteristiche le colonie con colore dal rosa al rosso porpora. Vengono comunque effettuati i test biochimici di conferma dell'ossidasi e di fermentazione su almeno 5 colonie, in quanto le Enterobacteriaceae fermentano il glucosio e sono ossidasi negative, poiché mancano della catena del citocromo C-ossidasi.
4. **Batteri lattici (BL) di forma bastoncellare mesofili e termofili:** semina per inclusione in de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) agar, acidificato a pH 5,4 con acido lattico (5 mol.L^{-1}), con incubazione in anaerobiosi in giare chiuse ermeticamente a 30 e 44°C per 72 ore (ISTISAN 08/36); dopo l'incubazione almeno 4 colonie per piastra sono sottoposte a test di conferma, ossia colorazione di Gram, test della catalasi e dell'ossidasi. Sono considerati BL tutte le colonie Gram positive, catalasi (stemperando una porzione di colonia su vetrino porta-oggetti in presenza di acqua ossigenata (H_2O_2) al 5%), ed ossidasi negative.

5. **Batteri lattici (BL) di forma coccica mesofili e termofili:** semina per inclusione in M17 agar incubati aerobicamente a 30 e 44°C per 48 ore (ISTISAN 08/36) seguiti da colorazione di Gram, test della catalasi e dell'ossidasi.
6. **Enterococchi:** semina per inclusione in rapid *Enterococcus* agar (REA) incubato aerobicamente a 44°C per 48 ore. Le colonie sospette sono state sottoposte ai test di conferma della catalasi e dell'idrolisi dell'esculina (Biorad).
7. **Pseudomonadi:** semina in *Pseudomonas* agar base (PAB) supplementato con fucidina cetrimide 10 mg/ml incubato aerobicamente a 20°C per 48 ore.
8. ***Escherichia coli* β -glucuronidase positiva:** semina per inclusione in Triptone Bile Glucuronide (TBX) agar incubato aerobicamente a 44°C per 24 ore (ISO 16649-2:2010).
9. **Clostridi solfito riduttori e spore:** semina per inclusione in Iron Sulfite Agar (ISA) incubato anaerobicamente a 3°C per 24-48 ore (ISO 15213: 2003).
10. **Stafilococchi coagulasi-positivi (*S. aureus* ed altre specie):** semina per inclusione in Baird Parker RPF Agar incubato a 37°C per 24-48 ore (ISO 6888-1:1999 Amend. 1:2003).

La ricerca di *Salmonella spp.* e *Listeria monocytogenes* è stata effettuata in 25 gr di campione mediante la metodica immuno-enzimatica a fluorescenza ELFA (enzyme linked fluorescent assay) con lo strumento VIDAS (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France).

Per *Salmonella spp.* il metodo utilizzato prevede un pre-arricchimento in buffered peptone water (BPW) a 37°C per 16-20 ore, seguito dall'immunoconcentrazione Salmonella II VIDAS (ICS2).

Per *L. monocytogenes* il metodo prevede un pre-arricchimento in Half.Fraser broth a 30°C per 24-26 ore e successivamente un arricchimento secondario in Fraser broth a 37°C per 24-

26 ore. I campioni eventualmente positivi sono confermati mediante subcoltura in XLD agar per *Salmonella spp.* e Aloa agar per *L. monocytogenes*.

Tutte le conte microbiologiche sono state effettuate in duplicato ed i risultati espressi in unità formanti colonie per grammo (cfu/g).

2.3 Analisi chimico-fisiche

Parallelamente alle analisi microbiologiche, tutti i campioni sono stati sottoposti ad analisi fisico-chimiche.

Umidità, grasso, sale (NaCl) e solidi totali sono stati determinati mediante tecnologia del vicino infrarosso NIR (Near InfraRed) che si basa sul principio di assorbimento da parte della materia dell'energia radiante con una lunghezza d'onda compresa tra 700 e 2500 nm. Per tale determinazione ci si è avvalsi dello strumento FoodScan analyser (Foss, Hillerød, Denmark), che si avvale della tecnologia NIT (Trasmittanza del vicino infrarosso) che misura la frazione di energia rimanente dal passaggio di un raggio luminoso attraverso il campione nello spettro di lunghezza d'onda compreso tra 850 e 1050 nm.

Il campione da analizzare viene preventivamente frullato e posto all'interno di una capsula Petri alloggiata nell'apposito vano dello strumento precedentemente sottoposto al controllo di stabilità giornaliero. I risultati vengono espressi in percentuale (g/100 g).

Il contenuto delle ceneri è stato determinato secondo gli Standard IDF (1964), mentre azoto totale ed azoto solubile sono stati determinati mediante il metodo di Kjeldahl (ISO/IDF, 2001) ed i risultati espressi in percentuale (g/100 g). L'indice di maturazione è stato calcolato come rapporto espresso in percentuale tra l'azoto solubile e l'azoto totale.

Il pH è stato misurato con il metodo potenziometrico mediante pH-metro (DocuMeter Sartorius; Data Weighing Systems, Inc., Elk Grove, IL, USA) dotato di sonda inserita direttamente all'interno del campione di formaggio.

L'attività dell'acqua (a_w) è stata determinata secondo la metodica ISO 21807:2004 attraverso lo strumento HygroPalm (Rotronic, Bassersdorf, Germany). Un campione rappresentativo del formaggio nella sua interezza è stato posto dopo sminuzzamento all'interno di una capsula alloggiata nello strumento. La lettura dei valori registrati è stata effettuata dopo la stabilizzazione dei valori di a_w .

2.4 Analisi sensoriale

La definizione del profilo sensoriale di un prodotto è l'elemento di continuità tra due dimensioni altrimenti scollegate, ossia quella della produzione e quella dei consumatori, rispettivamente campo d'indagine delle scienze naturali e delle scienze umane.

L'aroma è uno dei più importanti criteri di qualità sia per i formaggi freschi che per quelli stagionati. Il gradimento da parte dei consumatori dipende soprattutto dalla qualità sensoriale, di cui l'aroma è uno dei fattori determinanti.

Durante la maturazione e la conservazione dei formaggi si assiste alla formazione di un'ampia varietà di componenti aromatiche volatili responsabili dell'aroma del formaggio che sono generate dall'attività enzimatica a carico di proteine, grasso, lattosio e citrato (Engels et al., 1997; Nijse et al., 1996). Tali componenti volatili sono utili per la definizione del profilo qualitativo ed aromatico e per valutare i cambiamenti che si verificano durante la maturazione e/o conservazione di un formaggio, orientando la scelta verso opportuni sistemi e tempi di conservazione e maturazione (Mulet et al., 1999). Questi sono altresì importanti per la

caratterizzazione dei formaggi e, soprattutto per le DOP, per la correlazione tra caratteristiche sensoriali tipiche e luogo di provenienza.

Per la definizione del profilo sensoriale della Vastedda della valle del Belice DOP e soprattutto per la valutazione della presenza di differenze organolettiche generate dai diversi tipi di packaging e dal tempo di conservazione è stata condotta un'analisi sensoriale descrittiva.

Sulla base di quanto indicato dalla ISO 13299:2010 un gruppo di 6 panelisti non addestrati (3 uomini e 3 donne di età compresa tra i 25 ed i 50 anni) hanno valutato una serie di descrittori visivi, olfattivi e gustativi.

L'analisi descrittiva effettuata si è articolata in due fasi:

- Fase qualitativa in cui il panel leader, ossia la persona che dirige le attività del panel, ha addestrato i soggetti al riconoscimento delle sensazioni ed all'utilizzo di un linguaggio condiviso.
- Fase quantitativa in cui i panelisti hanno effettuato le prove di assaggio dei campioni proposti loro in cieco, assegnando un punteggio su una scala. Nello specifico è stata utilizzata una scala lineare continua con indicazione degli estremi (ancore). I giudici hanno tracciato un segno sulla scala in corrispondenza del livello di intensità dello stimolo percepito in seguito all'assaggio; tale segno è stato successivamente convertito in numero sulla base della distanza dall'estremo sinistro. Tale tipo di scala si rivela particolarmente adatta quando si vogliono evidenziare le differenze esistenti tra i prodotti in test.

Prima di effettuare l'analisi statistica dei risultati per quantificare le differenze tra i prodotti è stata valutata l'affidabilità del panel verificando l'assonanza tra i giudici, l'abilità discriminante e la riproducibilità del panel.

I parametri sensoriali analizzati sono descrittori visivi (colore e struttura), descrittori olfattivi (intensità odore, odore burro, odore di latte e presenza di odori sgradevoli), descrittori gustativi

(salato, acido, dolce, amaro, piccante, masticabilità, solubilità e granulosità) e gradimento complessivo.

2.5 Analisi statistica

I risultati ottenuti dalle analisi microbiologiche, chimico-fisiche e sensoriali sono stati analizzati mediante analisi della varianza ANOVA (procedura GLM del software SAS 9.1.2, 2004) per misure ripetute che ha incluso gli effetti fissi della tecnologia di packaging (SV, MAP₁, MAP₂, PAR), del tempo di conservazione (0, 15, 30, 60, 90, 120, 180 giorni) e della lavorazione (1..4). Le medie stimate sono state confrontate con il test *t* di Student e le differenze sono state considerate significative per $P < 0,05$.

Per ottenere una visione d'insieme dei dati sensoriali è stato utilizzato un approccio multivariato mediante l'analisi canonica discriminante (procedura CANDISC del software SAS 9.1.2, 2004). L'analisi canonica discriminante utilizza delle nuove variabili, dette canoniche, che sono una combinazione lineare delle variabili originali, volta a massimizzare le differenze tra gruppi.

3 Risultati e discussione

3.1 Analisi microbiologiche

I risultati medi espressi in punti logaritmi delle conte microbiologiche dei campioni di vastedda sottoposti alle quattro tipologie di packaging sono mostrati in tabella 1.

I microrganismi *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae*, anaerobi solfito riduttori e stafilococchi coagulasi positivi sono risultati assenti o inferiori ai limiti di sicurezza microbiologica stabiliti dal regolamento CE 2073/2005. In accordo a quanto previsto dal presente regolamento, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, patogeni usati come marker di sicurezza alimentare, sono risultati assenti in 25 g di formaggio.

La popolazione microbica maggiormente rappresentata è costituita dai batteri lattici. Questi microrganismi autoctoni, derivati dal latte crudo, dalle attrezzature tipiche in legno utilizzate nella lavorazione e dall'ambiente sono i principali responsabili delle caratteristiche sensoriali del prodotto finito (Scatassa et al., 2015).

I batteri lattici sono un'importante fonte di sostanze antimicrobiche, le batteriocine (Cotter et al., 2005). Alcuni ceppi di batteri lattici, in particolare la maggior parte dei ceppi del genere *Lactobacillus*, sono sempre più riconosciuti come *health promoting*, cioè, batteri probiotici (Saxelin et al., 2005), mentre alcuni ceppi dello stesso genere sono noti per la produzione di peptidi bioattivi dalle proteine del latte, benefici per la salute (Korhonen e Pihlanto, 2003).

Come era prevedibile, considerata la natura dei batteri lattici, microrganismi aerobi/anaerobi facoltativi, le tecnologie di packaging non hanno influito sulle conte dei batteri lattici, così come evidenziato anche in altri studi (Lioliou et al., 2001; Masotti et al., 2012).

Maniar et al., (1994) in uno studio sul formaggio Cottage hanno dimostrato come i livelli di batteri lattici rimangono costanti ed indipendenti dalla tipologia di MAP utilizzata,

principalmente per effetto della temperatura di conservazione (4°C). Papaioannou et al. (2007) hanno messo in evidenza che la conta dei lattici si è mantenuta elevata in tutti i campioni di formaggio mantenuti alla temperatura di 12°C.

La tabella 2 riporta l'andamento temporale delle conte microbiologiche indipendentemente dal sistema di confezionamento. La concentrazione dei batteri lattici si mantiene elevata per tutto il periodo di osservazione. I batteri lattici nativi con funzione di starter sono maggiormente rappresentati nella fase iniziale e subiscono un'inversione di tendenza dopo i 60 giorni di conservazione. Situazione opposta si verifica invece per i batteri lattici non starter, che sono a livelli più bassi all'inizio per poi incrementare durante il periodo di osservazione.

Ciò riflette la normale evoluzione dei batteri lattici durante la maturazione dei formaggi, dove i ceppi con attività di starter, con un ruolo essenziale per l'acidificazione della cagliata e per lo sviluppo dell'aroma caratteristico del formaggio (Settanni e Moschetti, 2010), sono maggiormente rappresentati all'inizio, mentre i non starter responsabili dei processi lipolitici e proteolitici sono presenti in un secondo momento.

Gli enterococchi sono i batteri lattici meno rappresentati, con una concentrazione di 2-3 cicli log inferiore rispetto agli altri lattici. Essi appartengono ai batteri pro-tecnologici e spesso sono associati alle caratteristiche di tipicità dei formaggi stagionati (Foulqui  t al, 2006).

Analizzando la loro evoluzione durante il periodo di osservazione, possiamo notare come il loro numero aumenta durante tale periodo, indipendentemente dalla modalit  di confezionamento, raggiungendo valori massimi a 180 giorni di osservazione.

La carica microbica totale aumenta nel tempo a prescindere dal sistema di packaging. Ci    in accordo con altri studi (Mexis et al., 2011, Pluta et al., 2005; Eliot et al., 1998) in cui   stato evidenziato come l'evoluzione della carica microbica non varia tra MAP e confezionamento sottovuoto, mentre   influenzata negativamente dai sistemi di packaging attivo, quali assorbitori di ossigeno (OA) o emettitori di etanolo (EE).

Anche i livelli di coliformi ed E.coli non sono significativamente differenti tra le tecnologie di packaging. Questo dato, insieme all'assenza di Enterobacteriaceae, importante parametro indicatore dell'igienicità del processo, dimostra che la produzione della Vastedda della valle del Belice DOP, rispetta le buone pratiche di manifattura ed avviene in condizioni sanitarie adeguate alla sicurezza dei consumatori.

Un altro dato importante emerso dall'analisi dei risultati esposti è che i valori delle conte microbiologiche differiscono significativamente tra le diverse lavorazioni, riflettendo la normale variabilità esistente, così come messo in luce anche in altri studi (Fitzsimons et al., 1999; Williams et al., 2002).

Tabella 1: valori medi delle conte microbiologiche della Vastedda sottoposta a diverse tecnologie di packaging

						P value		
	MAP ₁	MAP ₂	PAR	SV	errore standard	Packaging	Tempo conservazione	Lavorazione
BL mesofili (cocchi)	7,6	7,65	7,52	7,71	0,067	ns	**	***
BL termofili (cocchi)	7,54	7,58	7,58	7,63	0,064	ns	***	***
BL mesofili (bastoncelli)	7,37	7,34	7,27	7,45	0,087	ns	***	*
BL termofili (bastoncelli)	6,90	6,96	6,86	6,95	0,091	ns	***	ns
Enterococchi	4,92	4,97	4,87	4,96	0,081	ns	***	***
CMT	6,85	6,81	6,86	6,84	0,133	ns	***	***
Coliformi totali	0,77	0,86	0,69	1,02	0,203	ns	*	***
E. coli	0,53	0,71	0,4	0,92	0,191	ns	ns	***

Tabella 2: evoluzione temporale dei parametri microbiologici

	15 g	30 g	60 g	90 g	120 g	180 g	errore standard
BL mesofili (cocchi)	7,78	7,77	7,67	7,38	7,45	7,56	0,09
BL termofili (cocchi)	7,74	7,74	7,65	7,40	7,29	7,35	0,08
BL mesofili (bastoncelli)	6,99	7,32	7,66	7,42	7,64	7,73	0,11
BL termofili (bastoncelli)	6,75	6,85	7,26	7,02	7,11	7,04	0,12
Enterococchi	4,66	4,84	4,95	5,21	5,36	5,41	0,11
CMT	6,75	6,71	6,70	7,16	7,36	7,54	0,18
Coliformi totali	0,92	0,11	0,61	0,89	1,52	1,19	0,27
E. coli	0,85	0,10	0,60	0,64	0,98	0,77	0,25

3.2 Analisi chimico-fisiche

I valori medi dei parametri fisici e chimici dei campioni di Vastedda sottoposti alle 4 tipologie di packaging e l'evoluzione temporale sono riportati rispettivamente nelle tabelle 3 e 4.

Dall'osservazione di tali valori è possibile mettere in evidenza come il contenuto di grasso, NaCl, sostanza secca e l'indice di maturazione, non differiscono tra le tipologie di packaging.

Il pH e l'attività dell'acqua sono invece significativamente differenti tra i 4 tipi di confezionamento, in particolare i valori di pH risultano più elevati nei formaggi confezionati in paraffina, mentre l' a_w risulta significativamente più bassa in paraffina e sottovuoto rispetto alla MAP₁.

Analizzando l'andamento temporale dei valori di pH possiamo osservare come questi subiscono un incremento all'aumentare della durata del confezionamento. Un aumento dei valori di pH nei primi mesi di conservazione dei formaggi, osservato in altri studi (McSweeney e Fox, 1999), è dovuto alla formazione di composti azotati a carattere alcalino e/o al catabolismo dell'acido lattico prodotto. Tale incremento è dovuto fondamentalmente all'alcalinizzazione generata dalla proteolisi, che subisce un'inversione di tendenza nel periodo successivo per effetto della liberazione degli acidi grassi (Park, 2001; McSweeney e Fox, 1999).

La riduzione dei valori di a_w e l'incremento dei livelli di pH potrebbe in qualche modo favorire lo sviluppo di popolazioni microbiche indesiderate, ma i valori ritrovati nel presente studio non sono comunque particolarmente rilevanti al punto da compromettere la sicurezza microbiologica del prodotto.

L'indice di maturazione calcolato come rapporto percentuale tra l'azoto solubile e l'azoto totale riflette l'evoluzione dei processi proteolitici che si verificano durante la maturazione/conservazione del formaggio. Esso è dovuto essenzialmente ad un insieme di processi enzimatici orchestrati da endo ed eso-peptidasi e da proteasi di origine batterica, nonché dagli enzimi naturalmente presenti nel latte e nel caglio che degradano il complesso

reticolo caseinico. L'evolversi del processo enzimatico è strettamente correlato al sussistere di un insieme di fattori del mezzo e dell'ambiente, quali umidità, pH, temperatura, contenuto di sale, acidi grassi liberi, etc. Esso è pertanto un parametro meramente descrittivo della proporzione di caseina progressivamente solubilizzata.

Non sono state osservate differenze significative dell'indice di maturazione tra le 4 tipologie di packaging. Ciò concorda con altri studi condotti sul formaggio "Myzithra Kalathaki" (Dermikiet al., 2008) in cui è stato dimostrato che l'utilizzo di miscele di gas con differenti percentuali di CO₂ non ha effetti protettivi nei confronti dei processi proteolitici del formaggio.

Inoltre esso subisce un incremento nel tempo raggiungendo valori massimi alla fine del nostro periodo di osservazione riflettendo la normale evoluzione metabolica dei formaggi durante il periodo di conservazione.

Tabella 3: parametri chimico-fisici delle Vastedde sottoposte a diversi sistemi di packaging								
						P value		
	MAP ₁	MAP ₂	PAR	SV	errore standard	Packaging	Tempo conservazione	Lavorazione
Grasso (%)	26,47	26,68	26,53	26,17	0,303	ns	ns	***
Proteine (%)	26,82 ab	28,06 a	26,51 b	26,84 ab	0,54	*	*	***
NaCl (%)	1,24	1,25	1,19	1,19	0,028	ns	***	***
Sostanza secca (%)	57,28	57,36	57,76	57,08	0,308	ns	ns	***
pH	5,72 a	5,72 a	5,79 b	5,71 a	0,028	*	***	***
Aw	0,986 a	0,983 ab	0,980 b	0,981 b	0,002	*	***	***
Indice maturazione (%)	16,93	17,52	19,98	17,32	1,45	ns	***	***

Tabella 4: evoluzione temporale dei parametri chimico-fisici								
	0	15 g	30 g	60 g	90 g	120 g	180 g	errore standard
Grasso(%)	26,40	26,25	26,41	26,67	26,35	26,37	26,79	0,40
Proteine (%)	26,76	26,14	26,20	26,23	26,07	26,43	27,04	0,25
NaCl	1,16	1,13	1,16	1,21	1,23	1,27	1,37	0,04
Sostanza secca (%)	56,68	57,16	57,37	57,37	57,23	57,69	58,08	0,41
pH	5,26	5,34	5,38	5,40	5,51	5,48	5,55	0,04
Aw	0,984	0,989	0,984	0,988	0,987	0,976	0,971	0,003
Indice maturazione (%)	8,34	10,59	11,76	18,59	24,48	25,26	26,54	1,92

3.3 Analisi sensoriali

Nelle tabelle 5 e 6 possiamo rispettivamente osservare le differenze tra le diverse modalità di packaging e l'evoluzione temporale dei descrittori analizzati.

Osservando i dati in tabella 5 è possibile notare che l'unica differenza significativa tra le tecnologie di confezionamento è quella relativa all'indice di gradimento complessivo. Il sottovuoto, infatti, sebbene equivalente alle altre modalità, per tutti i parametri osservati, risulta maggiormente apprezzato dai panelisti rispetto alla paraffina ed alla MAP₁. I dati relativi all'evoluzione temporale evidenziano come tutti i descrittori, eccetto la presenza di odori sgradevoli, aumentano durante il periodo di conservazione. In particolare, un insieme di descrittori con effetto chiaramente positivo sulle proprietà organolettiche della Vastedda della valle del Belice DOP subiscono una variazione durante il periodo di conservazione, contribuendo a definire il profilo di un prodotto di qualità, le cui caratteristiche di appetibilità ed accettabilità aumentano nel tempo.

I dati sensoriali sono stati analizzati anche mediante un approccio multivariato. Nella figura 1 è riportata la distribuzione delle osservazioni campionarie su un sistema di assi cartesiani costituiti dalla variabile canonica 1 (asse delle y) e dalla variabile canonica 2 (asse delle x). Le distanze di Mahalanobis tra i centromeri sono statisticamente significative per tutte le distanze analizzate, tranne tra E (90 giorni) ed F (120 giorni) e tra F (120 giorni) e G (180 giorni), così come è possibile notare nella tabella 8. Dall'osservazione del grafico e sulla base dei coefficienti di correlazione tra le variabili originarie e le due variabili canoniche, riferite ai descrittori sensoriali indicati nella tabella 7, possiamo osservare che le vastedde si distribuiscono in tre gruppi principali. In particolare il gruppo B costituito dalle vastedde fresche analizzate dopo 15 giorni dalla produzione, denota caratteristiche di un formaggio fresco ancora poco strutturato, con una minore omogeneità della struttura ed una minore solubilità rispetto agli altri formaggi

con differente tempo di conservazione. Il cluster formato dai gruppi E ed F ovvero dai formaggi a 120 e 180 giorni di conservazione mostra invece caratteristiche notevolmente diverse dal precedente gruppo sopra descritto. In particolare questi formaggi hanno una struttura più omogenea, una maggiore solubilità e sono caratterizzati da un maggior odore di burro e un minor odore di latte. L'odore di burro rappresenta una nota lattica tipica dei formaggi freschi; la sua persistenza fino alla fine del periodo di osservazione, insieme alla struttura omogenea e solubile delle vastedde conservate fino a 180 giorni testimonia come, nonostante l'evolversi dei processi enzimatici che fisiologicamente si verificano nei formaggi durante la conservazione, le caratteristiche di freschezza di un prodotto giovane, che sono i principali punti di forza che rendono la vastedda particolarmente apprezzata tra i consumatori, si mantengono anche per un lungo tempo di conservazione.

Tab.5: Valori medi dei descrittori sensoriali nelle 4 tipologie di confezionamento							
	MAP ₁	MAP ₂	PAR	SV	Errore standard	P value	
						Confezionamento	Tempo conservazione
Colore	44,24	47,93	45,57	47,85	1,84	ns	***
Uniformità della struttura	83,49	82,54	81,97	84,77	1,96	ns	***
Odori pungenti	56,79	55,11	56,87	54,51	2,51	ns	***
Odore di burro	47,39	50,88	48,14	46,75	2,18	ns	***
Odore di latte	40,15	39,27	39,51	39,40	2,78	ns	***
Odori sgradevoli	2,80	1,97	2,16	2,89	0,56	ns	ns
Salato	19,73	18,82	20,84	18,37	1,77	ns	***
Dolce	40,32	38,43	36,77	40,91	2,59	ns	*
Acido	17,51	12,61	16,93	17,07	1,87	ns	***
Amaro	6,08	6,28	7,88	5,69	1,04	ns	***
Piccante	3,78	4,63	4,42	3,75	0,90	ns	*
Masticabilità	21,59	19,91	18,95	18,20	2,99	ns	***
Solubilità	76,00	78,08	78,45	81,14	2,38	ns	***
Granulosità	11,41	9,37	16,97	13,72	2,62	ns	***
Gradimento complessivo	56,09 a	61,01 ab	56,82 a	64,87 b	3,10	*	***

Tabella 6: evoluzione temporale dei descrittori sensoriali								
	0 g	15 g	30 g	60 g	90 g	120 g	180 g	Errore standard
Colore	45,92	35,00	63,73	47,31	42,94	45,22	44,67	2,37
Uniformità struttura	87,59	61,06	84,92	83,23	84,83	90,33	90,33	2,53
Odori pungenti	48,52	56,11	63,69	54,53	63,06	52,94	51,89	3,23
Odore di burro	32,96	44,12	58,41	43,19	52,89	53,94	52,50	2,81
Odore di latte	48,52	26,25	51,15	47,10	39,72	32,11	32,22	3,58
Odori sgradevoli	3,15	1,90	3,29	1,90	3,28	1,83	1,83	0,73
Salato	25,56	20,74	23,97	21,54	19,00	11,06	14,22	2,76
Dolce	42,96	33,06	39,37	47,81	41,67	34,94	33,94	3,34
Acido	28,89	19,49	15,80	18,49	9,44	10,06	10,06	2,41
Amaro	13,70	10,74	7,06	4,14	3,06	3,22	3,44	1,34
Piccante	6,29	2,31	2,74	3,12	3,4	4,61	6,50	1,63
Masticabilità	39,81	27,08	22,06	15,91	4,33	9,55	18,89	3,86
Solubilità	65,18	59,21	80,99	73,37	90,61	89,78	89,78	3,07
Granulosità	8,33	13,00	5,51	6,60	13,83	12,72	30,06	3,41
Gradimento complessivo	40,93	57,40	62,74	58,70	69,44	64,61	64,06	3,99

Tabella 7: Analisi canonica discriminante- correlazione tra le variabili sensoriali e le variabili canoniche

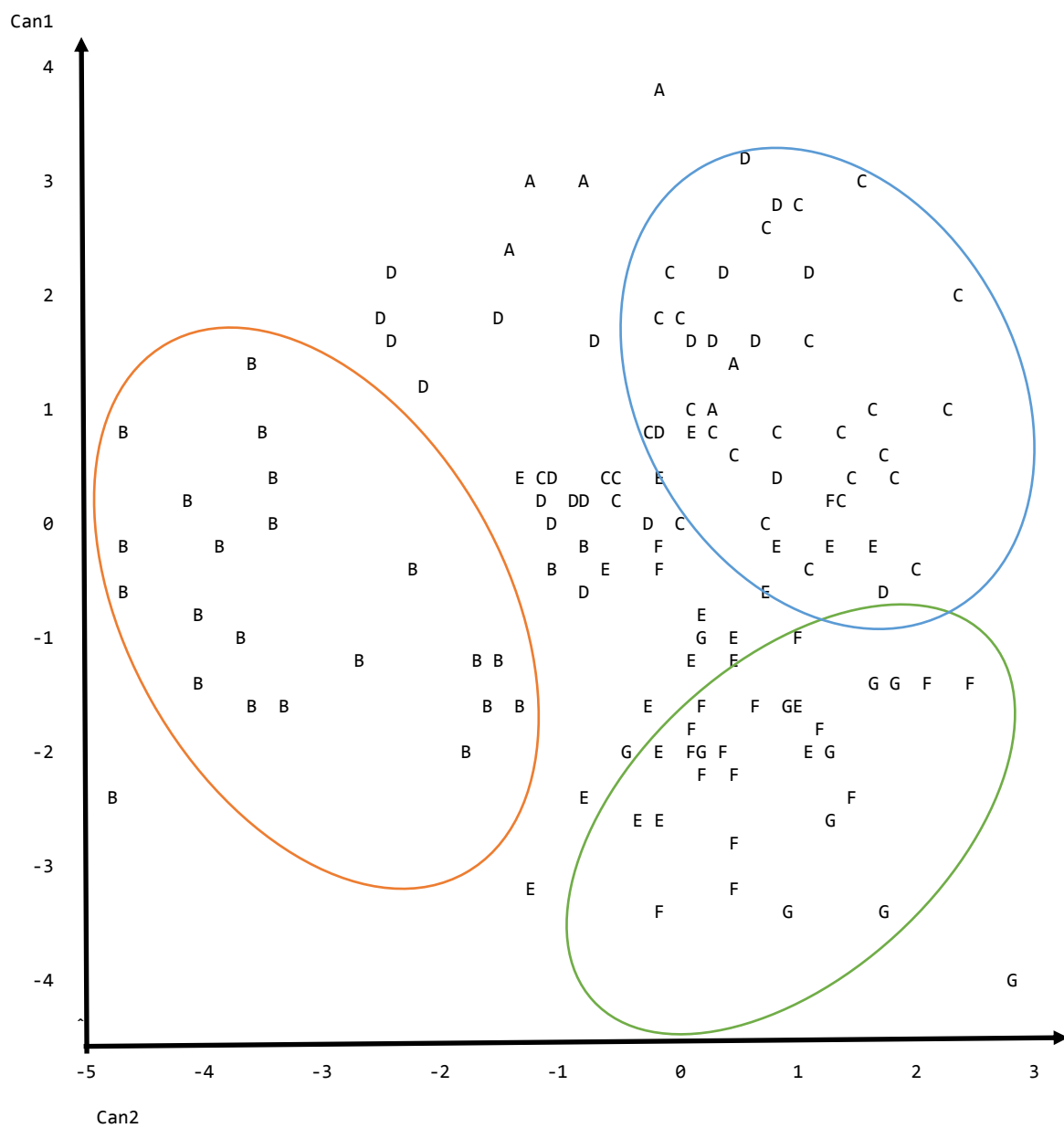
Variabile	Variabile canonica 1	Variabile canonica 2
Colore	0,44	0,68
Omogeneità struttura	0,25	0,49
Intensità odore	0,03	-0,26
Odore burro	-0,89	0,13
Odore latte	0,76	0,35
Odori sgradevoli	-0,14	0,31
Salato	0,58	0,17
Dolce	0,22	-0,04
Amaro	-0,02	-0,24
Piccante	-0,43	0,23
Masticabilità	0,41	-0,22
Solubilità	-0,26	0,59
Granulosità	-0,53	0,16
Gradimento complessivo	-0,12	-0,22
Variabilità spiegata (%)	44,8	35,2

Tabella 8: Analisi canonica discriminante-distanze di Mahalanobis tra i diversi periodi di tempo di conservazione delle Vastedde

Tempo	0 (A)	15gg (B)	30gg (C)	60gg (D)	90gg (E)	120gg (F)	180gg (G)
0 (A)	0	18,95	10,22	4,49	15,99	18,46	20,49
15gg (B)		0	21,25	13,51	13,20	15,10	17,59
30gg (C)			0	5,62	7,47	10,74	13,08
60gg (D)				0	6,36	9,62	12,36
90gg (E)					0	2,38 ¹	3,87
120gg (F)						0	1,26 ¹
180gg (G)							0

¹ =Distanze di Mahalanobis non significative (P>0,05)

Figura 1: grafico della Canonica 1 x Canonica 2 - variabile: tempo di conservazione (A:0g; B:15g; C:30g; D:60g; E:90g; F:120g; G: 180g)



Conclusioni

I risultati sopra descritti derivanti dallo studio non hanno evidenziato significative differenze per i parametri microbiologici, chimico fisici e sensoriali in funzione delle diverse tecnologie di packaging utilizzate. I dati delle conte microbiologiche, relativamente ai parametri indicatori di igienicità ed ai microrganismi patogeni ed alterativi, probabili causa di malattia per l'uomo, ci permettono di affermare che le quattro modalità di conservazione si equivalgono e pertanto possono essere considerate sicure in ugual misura. Tale ipotesi di equivalenza è supportata anche dai risultati delle analisi chimico-fisiche.

Dall'analisi sensoriale è emerso invece che, nonostante non vi siano differenze fra i descrittori analizzati per le 4 differenti tecnologie di packaging, il sottovuoto è quello che determina un indice di gradimento complessivo maggiore, rispetto soprattutto alla paraffina ed alla MAP₁, tale gradimento si mantiene elevato per tutto il periodo di conservazione. Dall'analisi multivariata dei dati sensoriali è altresì emerso come la conservazione a lungo termine (180 giorni), nonostante le naturali trasformazioni enzimatiche che si verificano nel formaggio durante la conservazione, non altera le caratteristiche di freschezza della vastedda, suggerendo pertanto che il sottovuoto, sistema di confezionamento attualmente in uso, può essere utilizzato anche per una conservazione superiore ai tre mesi, che rappresenta il tempo massimo di conservazione adottato dai produttori del Consorzio di Tutela.

Bibliografia

1. Arvanitoyannis I. & Gorris L.G.M. (1999). Edible and biodegradable polymeric materials for food packaging or coating. In F.A.R. Oliveira & J.C. Oliveira (Eds.) Processing foods: quality optimization and process assessment. Boca raton: CRC press.
2. Cantoni C., Stella S., Cozzi M., Iacumin L., Comi G. (2003). Colorazione blu di mozzarelle. *Ind. Alimentari* 42:840-843.
3. Colchin L.M., Owens S.L., Lyubachevskaya G., Boyle-Roden E., Russek- Cohen E., Rankin S.A. (2001). Modified atmosphere packaged cheddar cheese shreds: influence of fluorescent light exposure and gas type on color and production of volatile compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49, 2277-82.
4. Cotter P.D., Hill C. Ross R.P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:777-788.
5. Daniels A.J. Krishnamurthi R., Rizvi S.S.H. (1985). A review of effects of carbon dioxide on microbial growth and food quality. *Journal of food science*, 63:1075-1080.
6. Dermiki M., Ntzimani A., Badeka A., Savva I.N., Kontominas M.G. (2008). Shelf-life extension and quality attributes of the whey cheese. *LWT Food science and technology*, 41, 284-294
7. Di Marzo S., Di Monaco R., Cavella S., Romano R., Borriello I., Masi P. (2006). Correlation between sensory and instrumental properties of Canestrato Pugliese slices packed in biodegradable films. *Trends in food science & technology*, 169-176.
8. Donnelly C.W. (2004). Growth and survival of microbial pathogens in cheese. In: Fox P.F., McSweeney P.L.H., Cogan T.M., Guinee T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Chapman & Hall, London, UK, pp.541-560

9. Durango A.M., Soares N.F.F., Andrade N.J. (2006). Microbiological evaluation of an edible antimicrobial coating on minimally processed carrots., *Food control* 17:336-41.
10. Dutta P.K., Tripathi S., Mehrotra G.K., Dutta J. (2009). Review:perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food chemistry* 114:1173-82.
11. Eliot S.C., Vuilleumard J.C., Emond J.P. (1998). Stability of shredded Mozzarella cheese under modified atmosphere. *Journal of food science*. 63, 1075-1080.
12. Engels V.J.M., Dekker R., de Jong C., Neeter R., Visser S.A. (1997). A comparative study of volatile compounds in the water-soluble fraction of various types of ripened cheese. *International dairy journal*, 7,255-263.
13. Esmer O.K., Balkir P., Seckin A.K., Irkin R. (2009). The effect of modified atmosphere and vacuum packaging on the physicochemical, microbiological, sensory and textural properties of Crottin de Chavignol cheese. *Food science and technology research*, 15(4): 367-376.
14. Esmer O.K., Balkir P., Seckin A.K., Irkin R. (2009). The effect of modified atmosphere and vacuum packaging on the physicochemical, microbiological, sensory and textural properties of Crottin de Chavignol cheese. *Food science and technology research*, 15(4): 367-376.
15. Farber J.M. (1991). Microbiological aspects of modified-atmosphere packaging technology- a review. *Journal of food protection* 54(1):58-70.
16. Fitzsimons N.A., Cogan T.M., Condon S., Bereford T. (1999). Phenotypic and genotypic characterization of nonstarter lactic acid bacteria in mature cheddar cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 3418-3426.
17. Floros J. D., Nielsen P.V. Farkas J. K. (2000). Advanced in modified athmosphere and active packaging with applications in the dairy industry. *Packaging of milk products. Bullettin of the IDF*, 346:22-28. International dairy federation, Brussel, Belgium.

18. Floros J.D. Nielsen P.V. (2000). Advances in modified atmosphere and active packaging with application in the dairy industry. *Packaging milk prod* 346:22-28.
19. Foulquié Moreno M.R., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E., De Vuyst L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International journal of food microbiology*. 95, 51-59.
20. Gammariello D., Conte A., Di Giulio S., Attanasio M., Del Nobile M.A. (2009). Shelf-life of stracciatella cheese under modified-atmosphere packaging. *Journal of dairy science*,92(2): 483-490.
21. Garabal J.I., Rodríguez-Alonso P., Franco D., Centeno J.A. (2010). Chemical and biochemical study of industrially produced San Simòn da Costa smoked semi-hard cow's milk cheeses: effects of storage under vacuum and different modified atmospheres. *Journal of Dairy Science*, 93(5), 1868-1881.
22. Guilbert S., Gontard N., Gorris L.G.M. (1996). Prolongation of the shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. *Food science and technology*, 29,10-17.
23. Guinee T.P., Fox P.F. (2004) Salt in cheese: physical, chemical and biological aspects. In "Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology", Vol. I, General Aspects (ed. PF Fox, PLHMcSweeney, TM Cogan, TP Guinee), 207-259. Elsevier Academic Press, London, UK.
24. Haouet M. N., Altissimi M. S., Scuota S., Cenci T. (2008). Spoilage mechanisms evaluation to predict the shelflife of fresh cheeses. Shelf Life International Meeting, Ischia, June 2008.
25. Korhonen H., Pihlanto A. (2003). Food-derived bioactive peptides—opportunities for designing future foods. *Curr. Pharm. Des.* 9:1297–1308.

26. Kosikowski F.V., Brown D.P. (1973). Influence of carbon dioxide and nitrogen on microbial populations and shelf life of Cottage cheese and sour cream. *Journal of dairy science* 56(1):12-18.
27. Lioliou K., Litopoulou-Tzanetakis E., Tzanetakis N., Robinson R.K. (2001). Changes in microflora of Manovri, a traditional Greek whey cheese during storage. *International journal of dairy technology*. 54, 100-106.
28. Maniar A.B., Marcy J.E., Bishop J.R., Duncan S.E. (1994). Modified atmosphere packaging to maintain direct set Cottage cheese quality. *Journal of food science* 59(6):1305-1308.
29. Masotti F., Battelli G., De Noni I. (2012). The evolution of chemical and microbiological properties of fresh goat milk cheese during its shelf life. *Journal of dairy science*, 95,4760-4767.
30. McSweeney P.L.H.et Fox P.F.(1999). Cheese: methods of chemical analysis. *Chemistry, physics and microbiology*, second edition, 2:341-388. Ed PF Fox. Chapman & Hall, London.
31. Mexis S. F., Chouliara E., Kontominas M. G. (2011). Quality evaluation of gratedgraviera cheese stored at 4 and 12°C using active and modified atmosphere packaging. *Packaging technology and science*. 24, 15-29.
32. Moir C.J., Eyles J., Davey J.A. (1993). Inhibition of *Pseudomonas* in cottage cheese by packaging in atmospheres containing carbon dioxide. *Food microbiology*, 10:345-351.
33. Moreira M.d R., Pereda M., Marcovich N.E., Roura S.I. (2011). Antimicrobial effectiveness of bioactive packaging materials from edible chitosan and casein polymers: assesment on carrot, cheese abd salami. *Journal of food science* 76.1 (2011): M54-M63.
34. Mucchetti G., Neviani E. (2006). *Microbiologia e tecnologia lattiero-casearia- qualità e sicurezza*. Ed. Tecniche nuove.

35. Mucchetti G., Carminati D., Addeo F. (1997). Tradition and innovation in the manufacture of the water buffalo Mozzarella cheese produced in Campania. In Proceedings of the 5th World Buffalo Congress (pp.173-181) Caserta, Italy.
36. Mulet A., Eschiriche I., Rossello C., Tarrazzò J. (1999). Changes in the volatile fraction during ripening of Mahon cheese. Food chemistry, 65(2), 219-225.
37. Nijssse L.M., Visscher C.A., Maarse H., Willemsens L.C., Boelens M.H. (1996). Volatile compounds in food. Zeist: TNO.
38. Papaioannou G., Chouliara I., Karatapanis A., Kontominas M.G.m Savvaidis I.N. (2007). Shelf-life of a Greek whey cheese under modified atmosphere packaging. International Dairy Journal, 17, 358-364.
39. Park Y.W. (2001). Proteolysis and lipolysis of goat milk cheese. Journal of dairy science, 84 (E supplement), E84-E92.
40. Pereda M., Aranguren M.I., Marcovich N.E. (2009). Characterization of chitosan/caseinate films. Journal of applied polymer science.
41. Pikul J., Karczewska D., Cais-Sokolinska D., Dankow R. (2006). Physicochemical, microbiological and sensory changes occurring in tvarog wrapped in Eco Lean and vacuum packed during refrigerated storage. Pol. J. food nutr. Sci. 15/56, SI 1, 173-178.
42. Pintado M.E., Malcata F.X. (2000). Optimization of modified atmosphere packaging system with respect to physicochemical characteristics of Requeijão. Food Research International, 33, 821-832.
43. Pluta A., Ziarno M., Kruk M. (2005). Impact of modified atmosphere packaging on the quality of grated mozzarella cheese. Polish journal of food nutrition science. 14/55, 117-122.
44. Pluta A., Wnuk B., Ziarno M., Berthold A. (2003). Effects of packaging systems on the quality of tvorog cheeses. Zywn. Nauka technol. Jakosc 4 (37) Supl., 330-340.

45. Quintavalla S., Vicini L. (2002). Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat sci* 62:373-80.
46. Riva M. (2001). Previsione e controllo della shelf life di prodotti lattiero-caseari mediante dispositivi TTI. *Latte*, 26(10), 120-130.
47. Robertson G.L. (1993). Packaging of dairy products. In G.L. Robertson (Ed.), *Food packaging*. New York: H.A. Hughes.
48. Ross R.P., Morgan S., Hill C., (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. *International journal of food microbiology*, 79.
49. Saxelin M., Tynkkynen S., Mattila-Sandholm T., de Vos W. (2005). Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16:204–211
50. Scatassa M.L, Cardamone C., Miraglia V., Lazzara F., Fiorenza G., Macaluso G., Arcuri L., Settanni L., Mancuso I. (2015). Characterisation of the microflora contaminating the wooden vats used for traditional Sicilian cheese production. *Italian Journal of Food Safety* 2015; 4:4509.
51. Settanni L., Corsetti A. (2008). Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *International journal of food microbiology*, 121,123-138.
52. Settanni L., Moschetti G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*, 27, 691-697.
53. Tharanathan R.N. (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in food science and technology*, 14,71-78.
54. Verdini R.A., Rubiolo A.C. (2002). Texture changes during the ripening of Port Salut argentino cheese in 2 sampling zones. *Journal of food science*. 65, N.1, 168-172, 2000.
55. Walstra, P. (1993). The Syneresis of curd. In P. F. Fox (Ed.), *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*, Vol. 1 (pp. 141–191). London: Elsevier Applied Science.

56. Williams A.G., Choi S.C., Banks J.M. (2002). Variability of the species and strain phenotype composition of the non-starter lactic and bacterial population of Cheddar cheese manufactured in a commercial creamery. *Food Reviews International*, 35, 483-493.